

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

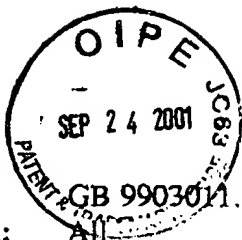
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



The
Patent
Office

INVESTOR IN PEOPLE

Application No: GB 9903011.6
Claims searched: All

Examiner: Michael R. Wendt
Date of search: 26 March 1999

Patents Act 1977 Search Report under Section 17

Databases searched:

UK Patent Office collections, including GB, EP, WO & US patent specifications, in:

UK Cl (Ed.Q): G1B (BAA, BCX, BCN)

Int Cl (Ed.6): G01N 24/08, 33/02, 33/15; G01R 33/465; A61K 35/78

Other: Online : EPODOC, PAJ, WPI

Documents considered to be relevant:

Category	Identity of document and relevant passage	Relevant to claims
A	EP 0099810 A1 (CNRS) See Abstract.	14

RECEIVED

SEP 26 2001

TC 1700

X	Document indicating lack of novelty or inventive step	A	Document indicating technological background and/or state of the art.
Y	Document indicating lack of inventive step if combined with one or more other documents of same category.	P	Document published on or after the declared priority date but before the filing date of this invention.
Z	Member of the same patent family	E	Patent document published on or after, but with priority date earlier than, the filing date of this application.

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Numéro de publication:

0 099 810
A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 83401414.4

(51) Int. Cl.³: G 01 N 24/08

(22) Date de dépôt: 08.07.83

G 01 N 24/02, G 01 N 33/00

(30) Priorité: 09.07.82 FR 8212148

(43) Date de publication de la demande:
01.02.84 Bulletin 84/5

(64) Etats contractants désignés:
DE FR GB IT

(71) Demandeur: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)
15, Quai Anatole France
F-75700 Paris(FR)

(72) Inventeur: Bengsch, Eberhard Richard
81 rue de la Somme
F-45160 Olivet(FR)

(72) Inventeur: Grivet, Jean-Philippe
321 rue de la Vallée
F-45160 Olivet(FR)

(72) Inventeur: Schulten, Hans-Rolf
Flotostrasse 12
D-5090 Leverkusen(DE)

(74) Mandataire: Gillard, Marie-Louise
Cabinet Beau de Loménie 55, Rue d'Amsterdam
F-75008 Paris(FR)

(64) Procédé pour déterminer les origines bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques et moyens pour sa mise en oeuvre.

(67) Procédé pour identifier et, le cas échéant, pour déterminer quantitativement les origines bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques en fonction de leur taux global et avant tout de leur matrice caractéristique de répartition intramoléculaire en isotopes légers, stables et magnétiquement actifs, en particulier en carbone-13, caractérisé en ce qu'il consiste à déterminer la répartition isotopique positionnelle d'au moins un isotope léger, stable et magnétiquement actif outre que le deutérium par résonance magnétique nucléaire quantitative par transformées de Fourier;

Application, détermination de l'origine bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques et moyens pour sa mise en oeuvre.

EP 0 099 810 A1

0099810

1

Procédé pour déterminer les origines bio-et/ou techno-synthétiques de substances organiques et moyens pour sa mise en oeuvre.

La présente invention concerne un procédé pour déterminer, qualitativement, le cas échéant quantitativement, les origines bio-
5 et/ou techno-synthétiques de substances organiques. En effet, pour des substances organiques de toutes sortes, l'indication de leur origine peut être d'une grande importance, notamment dans les domaines de la chimie, de la biologie, de la chimie alimentaire, de la médecine, de la pharmacologie et dans tous les autres domaines où il importe
10 d'élucider l'origine de ladite substance.

Les quelques procédés connus pour la détermination de l'origine de substances organiques sont généralement basés sur la mise en évidence d'un ou de plusieurs produits secondaires ou d'impu-
15 retés qui accompagnent de manière caractéristique la substance organique considérée en fonction de son mode de synthèse. La possibilité d'éliminer ou d'ajouter un tel produit indicateur/marqueur, chimiquement différent de la substance à examiner, entraîne l'inconvénient de pouvoir fausser le résultat d'une éventuelle analyse dans le sens souhaité.

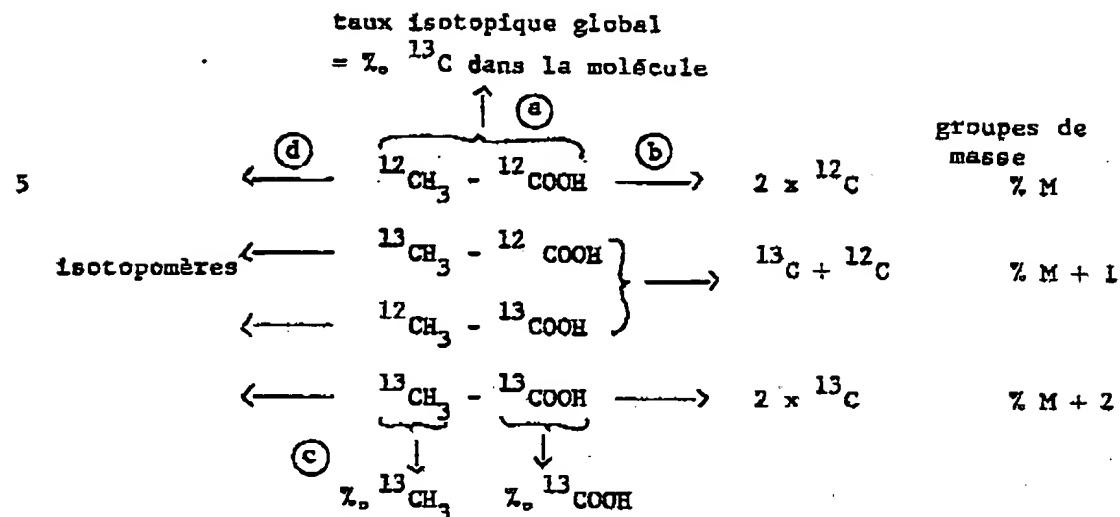
20 En conséquence, une analyse à l'abri de toute falsification ne peut être effectuée que directement sur la substance elle-même, à l'état chimiquement pur. Une substance pure est représentée par sa formule chimique structurale qui est identique pour un composé donné, quelle que soit son origine : biologique, technique ou mixte.

25 Il convient donc de rechercher des différences caractéristiques et reproductibles à l'intérieur de l'identité chimique, c'est-à-dire d'utiliser le fait que la formule chimique structurale n'est qu'une approximation de la réalité moléculaire qui couvre en effet des structures isotopiques différentes.

30 On sait en effet que, pour une substance donnée, il existe dans le cadre de sa forme structurale plusieurs espaces isotopiques dénommées couramment "isotopomères". Leur nombre croît rapidement avec la complexité de la molécule. A titre d'exemple, on indique ci-après l'isotopie carbone-13/carbone-12 pour l'acide
35 acétique :

0099810

2



10 taux isotopique positionnel = % ^{13}C

On définit ainsi, aussi bien pour ce cas particulier que de manière générale, 4 paramètres d'identification isotopique:

- a. Le taux isotopique global (a) qui correspond ici à l'abondance moyenne du carbone-13 dans les 2 positions possibles.
- 15 b. Les groupes de masse dans lesquels on trouve la somme des concentrations des isotopomères présentant une masse identique, mais une répartition isotopique différente.
- c. Le taux isotopique position par position. Il existe autant de taux isotopiques positionnels (c) que de nombre de positions non équivalentes N susceptibles d'une substitution isotopique. Dans le

20 cas de l'acide acétique $^{12}\text{C} \longrightarrow ^{13}\text{C}$ est égale à 2.
- d. Les espèces à identité isotopique également dénommées isotopomères. L'isotopomère constitue le véritable corps chimique élémentaire. Il y a 2^N isotopomères lorsqu'il y a N positions non

25 équivalentes, et $2^N(N'+1)$... lorsqu'il y a en plus N' positions équivalentes, et ainsi de suite. Ainsi, le nombre des isotopomères pour l'acétate de sodium est $2^2=4$ par rapport à l'isotopie carbone-13/ carbone-12, $3+1=4$ par rapport au deutérium/protium. Leur nombre total par rapport aux atomes de carbone et d'hydrogène est donc de 16.
- 30 L'étude des isotopomères a déjà fait l'objet de nombreux travaux qui ont été effectués en milieu hautement enrichi.

0099810

3

- A cet effet, on peut citer les références ci-après concernant, d'une part, les travaux en milieu hautement enrichi relatifs au deutérium : (E. BENGSCH, M. CORVAL, Préparation de l'éthanol deutérié $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$. Bull. Soc. Chim. France 1963, 1867-68 - E. BENGSCH. Préparation de quelques homologues isotopiques de l'éthanol. Etude physico-chimique des conditions de leur synthèse et de leur purification. Diplôme d'Etudes Supérieures. Faculté des Sciences de Paris, mai 1966 - E. BENGSCH. Préparation et analyse spectroscopique des espèces isotopiques deutériées de l'éthanol $\text{C}_2\text{H}_{5-n}\text{D}_n\text{OH}$. Bull. Soc. Chim. France 4B, 1971, 15 - E. BENGSCH. Isotopieeffekte in der Protonen- und Deuteronenresonanz der deuterierten Homologen des Äthanol. Comptes-Rendus de l'Assemblée de la Société Chimique de la R.F.A., septembre 1971, p. 171-2 - E. BENGSCH. Contribution à l'étude de la molécule d'éthanol par résonance magnétique nucléaire. Deutériation et analyse positionnelle. Résonance du proton et du deuton. Effets d'isotopie. Doctorat d'Etat, Université de Paris VI, juin 1972 - E. BENGSCH, M. CORVAL, M. DELLAUMONY. Préparation des éthanols deutériés $\text{C}_2\text{H}_{5-n}\text{D}_n\text{OH}$. Bull. Soc. Chim. France, 1973, 1788-93 - E. BENGSCH. Résonance magnétique Nucléaire du proton et du carbone-13 : effets d'isotopie observés avec les méthanol deutériés. Actualité chimique, 1973, n°4, 100 - E. BENGSCH, M. CORVAL, G.L. MARTIN. Analyse isotopique de mélanges d'éthanols deutériés $\text{C}_2\text{H}_{5-n}\text{D}_n\text{OH}$. Organic Magnetic Resonance 6, 1974, 195-9); d'autre part, les travaux en milieu hautement enrichi relatifs au carbone-13 sont : (E. BENGSCH, M. PTAK. Analyse des spectres RMN du carbone-13 pour quelques acides aminés enrichis et les peptides correspondants. Dans "Stable Isotopes in the Life Sciences". Agence Internationale à l'Energie Atomique I.A.E.A., Vienne, Autriche, 1977, p. 197-206 - E. BENGSCH, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHULTEN. Non-statistical label distribution in biosynthesis ^{13}C enriched amino acids. 9e Conférence Internationale de RMN dans les Systèmes Biologiques, 1-6 septembre 1980, Bendor/Marseille - E. BENGSCH, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHULTEN. Non-statistical label distribution in bio-synthetic enriched amino acids. Z. Naturf. 36b, 1981, 1989-1996 - E. BENGSCH, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHULTEN Inter - and Intramolecular isotopic heterogeneity in biosynthetic ^{13}C - enriched amino acids dans Analytical Chemistry Symposium Series

0099810

4

"Stable Isotopes" vol. 11, p. 587-92 édité par H.L. Schmidt, H. Fürstel, K. Heinzinger Elsevier Amsterdam, Oxford, New York 1982.

En ce qui concerne les molécules biologiques, il est connu que la répartition globale et positionnelle des isotopes n'est ni statistique ni uniforme (H.L. SCHMIDT et F.J. WINKLER dans Ber. Deutsch Bot. Ges. 92, 1979, p. 185-191 et H. ZIEGLER dans Ber. Deutsch Bot. Ges. 92, 1979, p. 169-184). Elle varie au contraire en fonction des perturbations des conditions intracellulaires du fait que les systèmes enzymatiques de la matière vivante préfèrent plus ou moins l'isotope naturel majoritaire, c'est-à-dire le carbone-12 au carbone-13, le protium au deutérium, etc. Il en résulte pour les substances biologiques une discrimination en isotope lourd, créée avant tout par quelques réactions clefs de la photosynthèse. Cette discrimination se maintient essentiellement à travers le métabolisme secondaire, le cas échéant également à travers la chaîne alimentaire plante-herbivore-carnivore, de telle sorte que l'on peut espérer remonter à l'origine végétale, c'est-à-dire photosynthétique d'une substance donnée, lorsqu'on réussit à :

1. déterminer un nombre suffisant de paramètres isotopiques a, b, c, d;
2. systématiser, malgré la complexité des flux métaboliques, le phénomène de la répartition isotopique, c'est-à-dire se baser sur des standards reproductibles et prévisibles.

On a constaté notamment que, dans une molécule donnée, les groupes à caractère hydrophile, tels que par exemple $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_n\text{OH}$ avec $n = 0, 1$ ou 2 , et/ou les groupes facilement recyclables pendant le métabolisme, tels que par exemple le groupe $-\text{COOH}$, sont enrichis en isotope lourd par rapport à la teneur isotopique moyenne de la molécule, alors que les groupes hydrophobes, tels que par exemple $-\text{CH}_3$ ou $-\text{CH}_2-$, sont appauvris en isotope lourd.

Au contraire, pour une substance organique obtenue par synthèse technique, la répartition en isotopes est différente et tend à être homogène, car les procédés de synthèse fonctionnent avec des rendements proches de 100%. Ils évitent la ramification du flux de la matière; la totalité de celle-ci ou presque est convertie, les compositions isotopiques initiales et finales des fractions

0099810

5

moléculaires impliquées dans la réaction sont très proches. Les cas de disproportions isotopiques rencontrés dans les procédés de synthèse sont limités à quelques positions et prévisibles en fonction du procédé de synthèse utilisé.

5 Il en résulte que les caractéristiques isotopiques d'une substance donnée devraient permettre d'identifier l'origine de celle-ci.

On a déjà proposé de déterminer l'origine d'une substance organique par mesure, en abondance naturelle, du taux isotopique positionnel du deutérium par résonance magnétique nucléaire. A cet effet, on peut citer l'article de G.J. MARTIN et M.L. MARTIN paru dans Tetrahedron Letters vol. 22, n° 36, p. 3525-3528, 1981. Cependant, étant donné que l'eau lourde est un produit industriel bon marché, on peut par son adjonction fausser le cas échéant le résultat d'une telle détermination dans un sens souhaité. De plus, une telle détermination peut parfois n'être significative que de l'environnement de la substance à examiner, ce qui permet alors de définir plutôt les conditions climatiques de sa biosynthèse, sa provenance géographique et d'autres facteurs liés au milieu aqueux des biosynthèses. En effet, on a constaté que, par exemple, l'alcool éthylique présente, en fonction de son origine, des modifications assez spectaculaires de son taux de deutérium. Cependant, il s'est avéré que ces modifications sont extrêmement sensibles aux facteurs d'environnement définis ci-dessus et à la morphologie de la plante, de telle sorte qu'elles ne peuvent pas dans tous les cas servir d'unique critère pour déterminer l'origine biologique et/ou synthétique d'un alcool.

Il est donc nécessaire de déterminer d'autres caractéristiques isotopiques significatives de l'origine bio- et/ou technologique d'une substance, par exemple d'un alcool.

Jusqu'à présent, il n'a été possible de déterminer, en abondance naturelle pour le carbone-13, que le taux isotopique global (a) (par combustion totale de la molécule) et, de manière précaire et incertaine, les groupes de masse (b). Par ailleurs, on a tenté de déterminer les facteurs (c) et (d) selon la technique, comprenant des dégradations chimiques quantitatives, la combustion

0099810

6

des fragments recueillis à l'état pur et sans perte et la spectrométrie de masse des produits de combustion (CO_2 , H_2O). Cette technique est très longue à réaliser, limitée à quelques composés particuliers très simples et elle est peu fiable car elle exige des réactions chimiques susceptibles d'entraîner elles-mêmes un fractionnement isotopique.

On a maintenant trouvé un nouveau procédé pour déterminer qualitativement et/ou quantitativement l'origine d'une substance organique donnée, qui consiste à déterminer la répartition isotopique positionnelle d'au moins un isotope léger, stable et magnétiquement actif autre que le deutérium par résonance magnétique nucléaire quantitative. Sous son aspect général, le procédé de l'invention consiste à enregistrer par résonance magnétique nucléaire quantitative par transformée de Fourier, dans des conditions assurant une sensibilité suffisante et une parfaite proportionnalité entre le nombre de noyaux résonnants et l'amplitude du signal, les spectres des noyaux concernés, en particulier ceux du carbone-13, à calculer la surface des différentes raies et à comparer ces surfaces par rapport à la moyenne desdites surfaces.

Le procédé de l'invention rend accessibles de façon inattendue les paramètres (c) et (d) définis ci-dessus, en abondance naturelle, malgré les préjugés techniques existants notamment pour le carbone-13 selon lesquels :

1. on ne pouvait pas réaliser par RMN, en particulier du carbone-13, une analyse quantitative assez précise pour déceler les différences des abondances isotopiques naturelles, telles qu'elles résultent de la faible sélectivité d'une séquence de réactions chimiques et biologiques ;

2. si cela s'était avéré possible pour quelques cas exceptionnels et en milieu enrichi, il était impensable jusqu'à présent d'effectuer la même détermination sur des composés présentant seulement une abondance naturelle, par exemple en carbone-13;

3. les éventuelles règles trouvées pour la répartition intramoléculaire (c) systématique des isotopes dans les biomolécules, règles établies pour les milieux enrichis, ne sont pas transposables aux composés formés sous conditions d'abondance isotopique naturelle.

0099810

7

L'exploitation quantitative du spectre R.M.N. de la substance à examiner peut être effectuée par planimétrie, par intégration automatique et/ou par simulation spectrale itérative, c'est-à-dire en modifiant pour chaque isotopomère contribuant au spectre global et dont on connaît les paramètres spectroscopiques, son poids jusqu'à ce que les spectres calculés deviennent identiques aux spectres enregistrés.

Selon un autre mode de réalisation, on peut avantageusement procéder à une mesure différentielle par rapport à une position donnée dans la molécule prise comme référence isotopique interne.

10 Un autre mode de réalisation consiste dans l'enregistrement, dans des conditions identiques, des spectres en module. Ce mode de réalisation accentue la faible différence qui existe entre les différents signaux, c'est-à-dire que les pics les plus faibles sont diminués et les pics les plus grands sont relativement augmentés, 15 de telle sorte qu'on peut qualitativement reconnaître plus facilement les positions enrichies ou appauvries en carbone-13 sans intégration.

L'exploitation quantitative de l'isotopie intramoléculaire réalisée selon l'invention peut être avantageusement complétée par la détermination des groupes à masse égale (b) par spectrométrie 20 de masse, de préférence à désorption par champ, méthode sans fragmentation des molécules et de ce fait particulièrement apte à des déterminations isotopiques quantitatives. Cette méthode qui utilise de préférence la cationisation à l'aide d'un métal mono-isotopique comme le sodium convient particulièrement aux molécules biologiques 25 qui sont dans la plupart des cas des molécules polaires peu volatiles et sujettes à fragmentation et le cas échéant relativement compliquées; les méthodes classiques de la spectrométrie de masse ne laissent espérer aucun résultat pour ce type de molécules. L'obtention simple, rapide et précise des valeurs pour les groupes de masse 30 (paramètres a et b définis précédemment) est assurée par l'utilisation d'un enregistreur permettant l'accumulation de spectres (W.D. LEHMANN, H.R. SCHULTEN. Quantitative Feld désorption - Massenspektroskopie VI, Z. Anal. Chem. 289, 1978, 11-16 - H.M. SCHIEBEL, H.R. SCHULTEN. Depletion of ¹³ Carbon in the Biosynthesis of Vitamin B₁₂. Naturwissenschaften 67, 35 1980, 256-257). En outre, cette méthode a l'avantage de n'exiger que quelques microgrammes de substances.

0099810

8

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, on combine, pour déterminer l'origine bio- et/ou techno-synthétique d'une substance organique, la résonance magnétique nucléaire quantitative et la spectrométrie de masse, de préférence à désorption par champ. Dans ce cas, les intensités positionnelles déterminées selon l'invention peuvent être exprimées en taux absolus de carbone.

Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, la substance à examiner doit être en solution relativement concentrée. L'asservissement champ-fréquence est réalisé soit sur la résonance deutonique du solvant, si celui-ci est disponible sous forme deutériée (D_2O , $CDCl_3$ ou similaires), soit sur une substance deutériée miscible au mélange solvant/substance à examiner, soit sur un corps de référence placé dans un tube coaxial.

On indiquera ci-après les conditions particulièrement préférées pour l'enregistrement par R.M.N. des spectres des substances à examiner, qui assurent une sensibilité suffisante et une parfaite proportionnalité entre le nombre de noyaux résonnants et l'amplitude du signal :

- l'angle de nutation est de 90° ,
- le nombre de passages accumulés doit être compris entre 100 et 50 000, de préférence entre 5 000 et 20 000, avantageusement de 5 000,
- la résolution numérique doit être comprise entre 0,8 et 0,05 Hz/point, de préférence 0,1 à 0,2.

La digitalisation du signal doit être réalisée avec soin. Si le nombre de points par hertz est trop faible, les aires mesurées pour les raies fines sont sous-évaluées, ce qui fausse ainsi l'analyse isotopique.

- Pour éviter cet inconvénient, on doit soit :
- a) comparer préférentiellement des largeurs semblables,
 - b) choisir une résolution numérique telle que la raie la plus fine soit représentée par au moins 10 points,
 - c) choisir un algorithme d'intégration tel que l'erreur de troncation soit inférieure à 0,5%,

0099810

9

d) rendre toutes les largeurs pratiquement semblables soit par une multiplication exponentielle du signal avant la transformée de Fourier, soit par addition à l'échantillon d'un agent relaxant.

5 On réalise un découplage total des protons. Pour éviter toute altération du résultat par des effets d'isotopie sur l'effet nucléaire OVERHAUSER, on supprime ce dernier par la méthode de l'irradiation alternée décrite par R. FREEDMAN, H.D. HILL et R. KAPTEIN (Proton-Decoupled NMR Spectra of Carbon-13 with the Nuclear OVERHAUSER Effect Suppressed. J. Magn. Res. 7, 1972, 327-329).

10 Pour assurer le rétablissement quasi parfait de l'équilibre de BOLTZMANN après chaque irradiation, on observe après chaque passage un temps d'attente T_3 qui correspond à 10 fois les temps de relaxation T_2 peu différent de T_1 du noyau le plus lent.

15 Afin de réduire les temps de relaxation du carbone-13 à des valeurs de l'ordre d'une seconde, on ajoute des agents relaxants connus tels que, par exemple, le trichlorure de gadolinium. Quand l'échantillon ne doit pas être contaminé par des ions paramagnétiques, il faut accepter une durée d'enregistrement plus longue pouvant atteindre plusieurs jours lorsqu'on veut tenir compte des carbones quaternaires.

20 En cas de superposition des signaux à analyser ou lorsqu'on veut déterminer des isotopomères (paramètres d), on procède à des simulations spectrales (programmes BRUKER IIR CAL et LAOCOON 4 B) en modifiant itérativement la contribution qu'apporte chaque espèce isotopique au spectre global, le cas échéant à l'aide d'une planimétrie différentielle entre les spectres expérimentaux et simulés jusqu'à ce qu'il y ait identité. Pour ce faire, il faut tenir compte des paramètres R.M.N. : positions des signaux, les largeurs des raies, le cas échéant des couplages et des effets d'isotopie sur ces paramètres.

30 En général, les signaux du carbone-13 sont relativement espacés et certains spectromètres de R.M.N. ne possèdent pas une caractéristique d'intensité (courbe de réponse) rigoureusement identique sur toute la largeur du spectre dans le domaine de fréquences utilisées. En général, cette courbe de réponse est
35 principalement déterminée par les caractéristiques du filtre

0099810

10

5 passe-bas utilisé avant le convertisseur analogue numérique. On peut s'affranchir en partie de cet effet en choisissant une bande passante bien supérieure, par exemple trois fois supérieure à la largeur spectrale intéressante. Cependant, ceci entraîne une diminution importante du rapport signal/bruit, donc de la sensibilité.

On peut partiellement parvenir à éliminer cette source d'erreur en enregistrant les spectres des composés biologiques et techniques à comparer dans des conditions rigoureusement identiques.

10 Cependant, le moyen idéal pour palier cet inconvénient consiste à calibrer le spectromètre avec un tube de calibration contenant un mélange défini de composés qui ne produisent chacun qu'une seule raie en R.M.N. pour un isotope donné et dont on connaît pour chacun la teneur isotopique globale. Ce tube de calibration constitue un autre objet de l'invention. Les composés constituant le mélange de calibration sont pour
15 la R.M.N. du carbone-13 des composés à carbones équivalents, tous miscibles entre eux dans des proportions données, stables, inertes les uns par rapport aux autres et décomposables par combustion.

Le mélange de calibration préféré est un mélange de composés en quantités sensiblement égales en carbone-13, dont les raies sont espacées sur toute la largeur du spectre de façon relativement régulière.
20

A titre d'exemples de mélanges de calibrages appropriés aux fins de l'invention, on citera le mélange dans l'eau lourde des composés suivants pour lesquels on a indiqué entre parenthèses la position relative de leur signal par rapport au diméthylsulfoxyde, exprimée en ppm et
25 comptée positivement vers les champs faibles.

- thiocyanate de sodium NaSCN (+ 100 ppm)
- urée $\text{NH}_2 \text{CO NH}_2$ (+ 70 ppm)
- diméthylsulfoxyde $(\text{CH}_3)_2 \text{SO}$
- glycol $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ (-13,6 ppm)
- 30 - alcool méthylique CH_3OH (-23,7 ppm)

en des quantités telles que chaque composé apporte la même quantité molaire de carbone.

L'invention a également pour objet le tube de calibration contenant un mélange du type défini précédemment, le tube étant de
35 préférence un tube scellé.

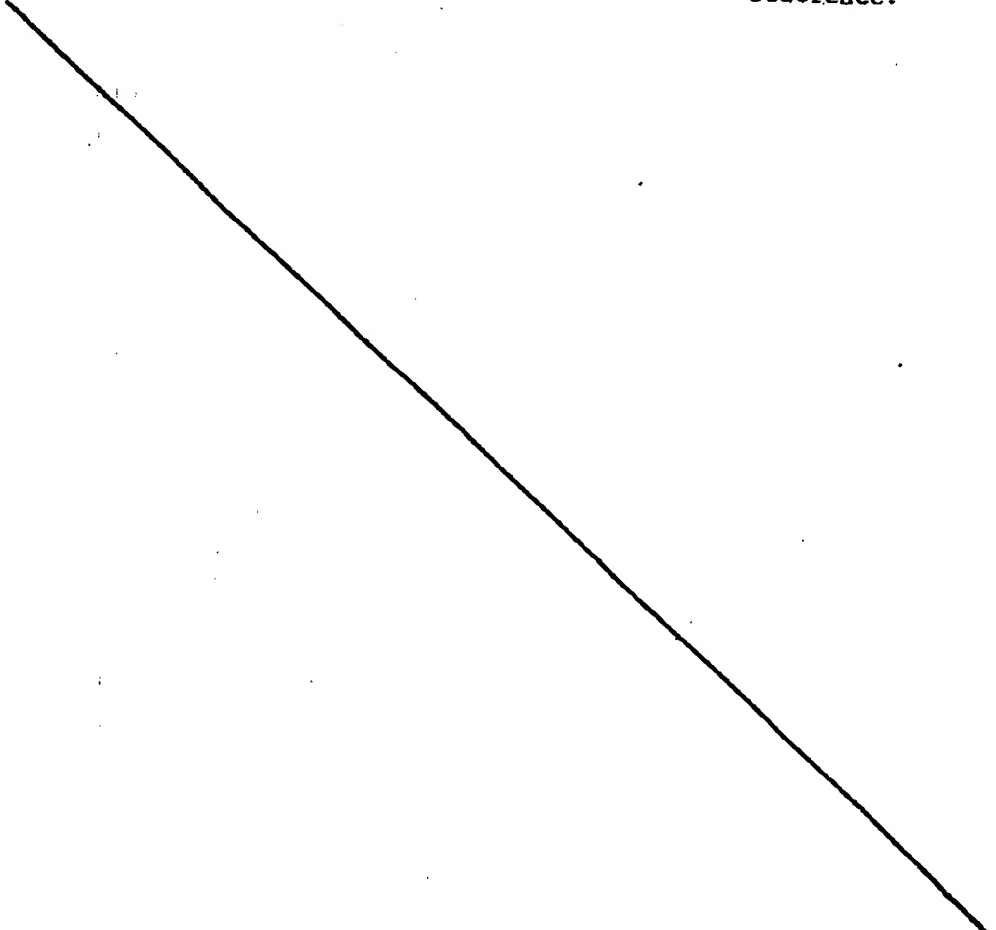
0099810

11

Le calibrage interne du spectre peut être automatisé à l'aide d'une fonction polynomiale de compensation. On introduit alors dans l'ordinateur les caractéristiques du mélange de calibrage, on enregistre le spectre du mélange de calibrage et l'ordinateur établit une fonction polynomiale de compensation qui neutralise les fluctuations dans la courbe de réponse du spectromètre, de telle sorte que pour chaque signal, indépendamment de sa position, la surface devienne strictement proportionnelle au nombre réel de noyaux C_{13} .

La mise en oeuvre du procédé de l'invention ne nécessite pas l'utilisation d'un étalon de référence.

Le procédé de l'invention permet de déterminer l'origine bio et/ou techno-synthétique d'une substance donnée en confrontant les caractéristiques isotopiques obtenues par le procédé de l'invention avec celles de substances témoins ou substances de référence.



0099810

12

En l'absence de telles substances témoins, le procédé de l'invention permet également de donner des indications sur l'origine de la substance en utilisant comme moyen standard d'analyse une matrice de répartition isotopique prédéterminée par la formule chimique structurale, schéma isotopique interne selon lequel, en particulier pour l'élément carbone, les groupes à caractère hydrophile et/ou facilement recyclables pendant le métabolisme, sont enrichis en isotope lourd par rapport à la teneur isotopique moyenne de la molécule, les groupes à caractère hydrophobe par contre sont appauvris en isotope lourd.

Dans le cas de molécules complexes, il est suffisant de déterminer quelques-uns des $2^N(N'+1)(N''+2) \dots$ isotopomères possibles, respectivement en prenant en considération seulement certaines, de préférence deux positions particulièrement révélatrices, quant à leur taux en isotope lourd, l'un par rapport à l'autre.

Le spectromètre R.M.N. utilisé pour la mise en oeuvre de l'invention peut avantageusement être couplé avec un microprocesseur, dans lequel on mémorise d'abord des compositions isotopiques standards, par exemple pour les substances en provenance de plantes C_3 , C_4 , CAM (mécanisme mixte entre C_3 et C_4) ou de cultures sous-marines et pour les substances techniques. On peut également introduire certains facteurs correctifs empiriques qui tiennent compte de facteurs climatiques, géographiques de l'environnement et de la morphologie de la plante d'origine, facteurs qui provoquent des fluctuations isotopiques. On introduit ensuite dans ce microprocesseur les caractéristiques spectrales de l'échantillon, en particulier celles concernant l'isotope carbone-13.

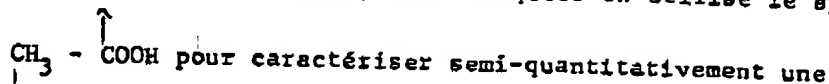
On notera que le procédé de l'invention est avantageusement réalisé avec l'isotope carbone-13, mais peut également être effectué pour l'azote-15, l'oxygène-17 et le soufre-33.

De plus, on peut combiner la détermination de l'isotopie du carbone-13 avec celle du deutérium ou des autres isotopes cités ci-dessus.

0099810

13

L'invention va être maintenant illustrée par les exemples non limitatifs ci-après, dans lesquels on utilise le symbole



hétérogénéité intramoléculaire typique d'un acide acétique plus
5 pauvre en carbone-13 méthylé et plus riche en carbone-13 carboxy-
lique.

Les spectres enregistrés selon les exemples ci-après l'ont été sur des spectromètres BRUKER WH 90, WP 200 SY et WM 400.

Exemple 1 : détermination de l'origine de l'acide acétique.

10 La méthode est basée ici sur l'unique détermination par R.M.N. quantitative du rapport intramoléculaire $^{13}\text{CH}_3/^{13}\text{COOH}$.

L'acide acétique est un composé-clé dans la biosynthèse. Cette molécule ultra-simple est pratiquement la seule pour laquelle on a réussi à déterminer les distributions internes du carbone-13
15 par la technique antérieure (voir E.R. SCHMIDT, H. GRUNDMANN, I. FOCY, Intramolecular $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Ratios of Acetic of Biological and Technical Origin. Biomedical Mass Spectrometry 8, 1981, 496-490 - W.G. MEINSCHEN, G.G.L. RINALDI, J.M. HAYES, D.A. SCHOELLER, Intra-
molecular Isotopic Order in Biologically Produced Acetic Acid 1,
20 1974, 172-174). Les résultats sont donc connus et le composé sert de substance-test pour le procédé selon l'invention.

Préparation des échantillons : l'échantillon purement biologique (I) a été obtenu à partir d'un vinaigre de vin 8,5° résultant d'une fermentation de surface "à l'ancienne" pendant 21 jours (vinaigre
25 "Vieille Réserve" MARTIN POURRET, ORLEANS). Dans une installation à extraction continue, on extrait 1 litre de ce vinaigre par 1,5 litre d'éther isopropylique pendant au moins 24 heures. L'acide acétique ainsi extrait est isolé et purifié par distillations fractionnées. On obtient environ 60 g d'acide acétique, qui reproduit essentiel-
30 lement la composition en carbone-13 de l'éthanol du vin de départ.

Comme échantillon d'origine technique (II), on a utilisé l'acide acétique glacial de RIEDEL-DE-HAEN (SEELZE, R.F.A.). Ce composé est fabriqué à partir de l'éthylène, produit

0099810

14

secondaire du procédé de craquage du pétrole, par oxydation de l'acétaldéhyde (procédé WACKER-HÖCHST). L'acide acétique, obtenu à partir de cet acétaldéhyde, est ensuite utilisé pour la fabrication d'acétate de polyvinyle. Par hydrolyse partielle de ce produit, on procède à une récupération d'une partie de cet acide acétique. Cet acide acétique dit de récupération est particulièrement pur du point de vue chimique et vendu tel quel. Plusieurs étapes de ce mode de fabrication sont susceptibles d'entraîner un fractionnement des isotopes du carbone tel que le taux en carbone-13 du groupement carboxyle se trouve diminué unilatéralement. Selon l'invention, on a trouvé que cette répartition isotopique est inverse de celle pour l'acide acétique d'origine bio-synthétique.

On a également utilisé un mélange équimoléculaire (III) des échantillons (I) et (II).

On a utilisé comme quatrième échantillon (IV) l'acide acétique glacial de MERCK (DARMSTADT, R.F.A.), pour lequel on a trouvé une distribution intramoléculaire strictement "biologique". On a constaté ultérieurement que ce produit provient de la distillation du bois.

Aux quatre échantillons d'acide acétique, on a ajouté environ 20% en volume d'eau lourde. Par adjonction de traces de trichlorure de gadolinium ($GdCl_3$), on a établi un temps moyen de relaxation magnétique T_2 du carbone-13 voisin d'une seconde. L'échantillon était alors de 0,002 à 0,005 molaire par rapport au gadolinium. On a ajouté du sel disodique de l'acide éthylènediaminotétracétique = EDTA (TITRIplex III, MERCK) comme complexant, en quantité molaire double par rapport au gadolinium.

Mesure de la répartition isotopique par résonance magnétique nucléaire du carbone-13.

On prend soin d'assurer un rapport signal/bruit suffisant et une parfaite proportionnalité entre le nombre des noyaux résonnants et l'amplitude des signaux en réalisant les conditions expérimentales suivantes.

On a procédé à une simple intégration des deux signaux de carbone-13 qui sont éloignés de 160 ppm.

10 000 passages, 0,2 : Hz/point, $T_3 = 10$ s.

0099810

15

Selon le type de sonde R.M.N., on a utilisé 0,7 ml (tubes de 5 mm) ou 2 ml (tubes de 10 mm) de l'échantillon.

Distinction de l'origine de l'acide acétique.

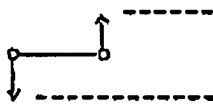
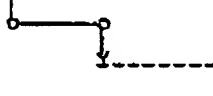

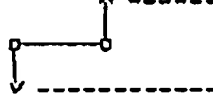
Pour chaque échantillon, on a calculé la surface des deux signaux du carbone-13, on a fait la moyenne de ces surfaces et déterminé l'écart Δ .

$$\Delta = \frac{S_{\max} - S_{\min}}{S_m}$$

S_{\max} = surface du signal qui correspond à la position la plus riche en C_{13}

S_{\min} = surface du signal qui correspond à la position la moins riche en C_{13}

S_m = moyenne des surfaces de tous les signaux pour la molécule

15	Echantillon	Taux relatif positionnel en carbone-13 $CH_3 - COOH$
	I	 $\Delta = + 12\%$
	II	 $\Delta = - 10\%$
20	III	 $\Delta \neq 0$
	IV	 $\Delta = + 12\%$

Le procédé selon l'invention permet donc de faire d'une manière directe, rapide et non destructive une distinction nette entre l'acide 100% à base de vin (I) qui présente une position hydrophile ($-COOH$) 12% plus riche en carbone-13 que la position hydrophile (CH_3) et l'échantillon technique utilisé (II) où la

25

0099810

16

- situation est presque inversée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'aide de la technique antérieure. Dans un mélange comme l'échantillon (III), les concentrations relatives peuvent être déterminées avec une précision d'environ 20% avec les appareils
- 5 actuellement sur le marché.

Exemple 2 : détermination de l'origine d'acides aminés, particulièrement de l'acide aspartique.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'exemple n° 1.

10 Préparation des échantillons.

- On a utilisé les acides aminés sérine (Ser), thréonine (Thr), acide glutamique (Glu) et acide aspartique (Asp). Leurs isomères optiques L proviennent des firmes MERCK (DARMSTADT, R.F.A.) et FLUKA (BUCHS, Suisse). Ils sont fabriqués en culture sous-marine par des
- 15 mutants de micro-organismes qui produisent sélectivement un seul acide aminé. Pour Asp, on a examiné également le racémate D/L, produit d'origine technique, qui est fabriqué à partir du gaz de craquage du pétrole ou de gaz de cokerie, par l'intermédiaire de l'anhydride maléique.

- 20 On a préparé des solutions de ces acides aminés dans l'eau lourde. Afin d'augmenter la solubilité, on a établi un milieu acide (acide chlorhydrique). Pour réduire les temps de relaxation du carbone-13, on a ajouté des traces de chlorure de gadolinium comme décrit précédemment.

25 Résultats

Les caractéristiques isotopiques suivantes ont été déterminées pour les trois échantillons suivants :

0099810

17

Echantillon	Origine	Concentration mol/l	pH	Détermination semi-quantitative : taux relatif positionnel en carbone-13
5 L-Ser	biol.	4,5	2,2	
10 L-Thr	biol.	2,5	0,5	
L-Glu	biol.	2,0	0,1	

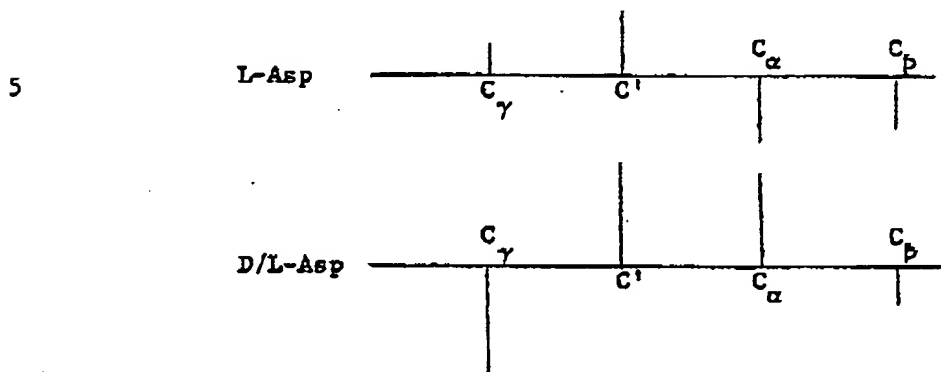
On donne ci-après les résultats chiffrés obtenus pour
15 l'acide aspartique L-Asp (origine biologique) et D/L-Asp (racémate-
origine technique).

Les deux spectres ont été enregistrés dans des
conditions strictement identiques, de sorte que la courbe de
réponse du spectromètre est la même.

groupes	L-Asp (biologique)		D/L-Asp (technique)	
	unités de *	différence en %, par rapport à la moyenne	unités de *	Différence en %, par rapport à la moyenne
25 C _γ O	1998 ± 10	+ 2	1906	- 28
C _γ O	2023	+ 15	1996	+ 18
C _α	1973	- 10	1990	+ 15
C _β	1979	- 7	1950	- 5

30 * mesurées avec un planimètre (OTT, type 131 L, KEMPTEN, RFA) permettant
une précision de 0,1 % en utilisant un bras de traçage de 50 cm.

On peut à partir de ces résultats représenter schématiquement les deux acides aspartiques de la manière suivante :



Comme cela a déjà été observé pour l'acide acétique d'origine bio-
10 logique, on trouve pour tous les acides aminés biologiques des tableaux
ci-dessus que les positions à caractère hydrophile et/ou facilement
recyclables pendant le métabolisme sont enrichies en carbone-13 par
rapport à la teneur isotopique moyenne de la molécule, les positions
à caractère hydrophobe par contre sont appauvries en ce même isotope.
15 Le groupement C_{α} des acides aminés se comporte comme une position à
caractère hydrophobe.

Il n'était pas prévisible que la complexité quasi illimitée des interactions biologiques aboutisse à un schéma de répartition isotopique finale aussi simple et généralement valable, schéma 20 qui, dans son application analytique, permet une première orientation rapide, sans obligation d'avoir recours à un composé de référence.

L'acide aspartique technique (D/L) présente une répartition isotopique presque inverse de celle observée pour le composé biologique (L-Asp). Bien que les deux produits soient considérés comme
25 étant chimiquement identiques, le procédé selon l'invention permet de déterminer sans ambiguïté leur origine respective.

Le taux isotopique global en carbone-13 (paramètre δ défini ci-dessus) a été déterminé pour l'acide glutamique L. La molécule contient 10,75 % ^{13}C par rapport à la totalité du carbone ($^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}$) ce qui représente un appauvrissement de 0,27 % en valeur absolue lorsqu'on prend comme référence l'abondance naturelle de cet isotope (11,12 % ^{13}C). L'appauvrissement relatif en ^{13}C de ce composé est donc de 25 %. Pour obtenir le taux global en carbone-13, on utilise de préférence pour les petites molécules (< 20 atomes)

0099810

19

de carbone) la combustion totale et l'analyse du rapport $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ (technique ancienne), alors que, pour des molécules plus grandes, la spectrométrie de masse à désorption par champ est plus avantageuse.

Exemple de réalisation n° 3 : détermination de l'origine de l'alcool

5 éthylque

L'alcool éthylique présente, en fonction de son origine, des modifications assez spectaculaires de son taux en deutérium.

Lorsqu'on compare les alcools de différentes origines bio-synthétiques, on touche également le problème important de la chaptalisation des vins.

- 10 L'origine d'un alcool n'a pu être déterminée jusqu'à présent qu'en utilisant simultanément les taux isotopiques globaux (paramètre a) et positionnels (paramètres c) et en deutérium et en carbone-13. Les effets sont moins spectaculaires pour le carbone-13, mais moins sensibles aux facteurs variables de l'environnement.

- 15 Le procédé selon l'invention basé sur la détermination des rapports des isotopomères essentiels de l'alcool (paramètres d) permet une détermination précise de l'origine. Parmi les $2^N(N'+1)(N''+1) = 2^2(3+1)(2+1) = 48$ isotopomères possibles de l'éthanol

- 20 $N^2 = 2$ positions non équivalentes du carbone,
 $N' = 3$ positions équivalentes d'hydrogène méthylque,
 $N'' = 2$ positions équivalentes d'hydrogène méthylénique,
le proton hydroxylique échangeable n'étant pas compté, les six isotopomères suivants participent avec une probabilité plus élevée
25 que 0,01% : $^{12}\text{CH}_3^{12}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{13}\text{CH}_3^{12}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{12}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{12}\text{CH}_2\text{D}^{12}\text{CH}_2\text{OH}$ et $^{12}\text{CH}_3^{12}\text{CHDOH}$. Dans le tableau ci-dessous, le rapport de ces isotopomères ressort semi-quantitativement.

Préparation des échantillons

- Les alcools ont été préparés et/ou extraits selon un
30 procédé classique (L. GATTERMANN, H. WIELAND, Praxis des Organischen Chemikers, Walter de Gruyter-Verlag, BERLIN, 1954, p. 350-1).

- On a utilisé de l'alcool en provenance d'un vin de table rouge 10° de Béziers et d'un vin rouge d'Algérie 12° qui ont à peu près les mêmes caractéristiques isotopiques (échantillon I),
35 d'un vin blanc Sylvaner 10° qui montre une chaptalisation (II), de l'alcool de provenance de sucre de betterave (III), de sucre de

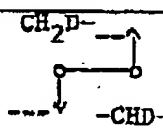
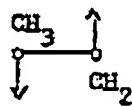
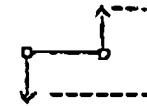
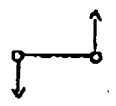
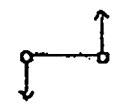
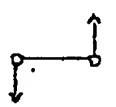
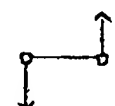
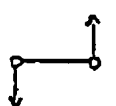
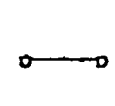
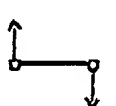
0099810

20

canne et glucose de maïs (IV). On a également examiné un alcool techno-synthétique (V) à base d'éthylène, gaz de craquage de produits de pétrole.

Résultats

- 5 Les résultats semi-quantitatifs sont présentés dans le tableau suivant, en utilisant pour la répartition positionnelle des isotopes le symbole défini et déjà utilisé ci-dessus. Les taux isotopiques globaux (appauvrissement en isotope lourd) obtenus en utilisant comme étalon intermédiaire un échantillon défini d'amidon de blé
- 10 sont exprimés en ‰, par rapport au standard isotopique international tel que défini par H. CRAIG Geochim. Cosmochim. Acta 12,133-149 (1957)

Echantillon	taux isotopique (‰)			
	deutérium		carbone-13	
	global	positionnel	global	positionnel
15 I (vigne)	- 50		- 25	
II (vigne + sucre)	- 40		- 22	
III (sucre betterave)	- 20		- 20	
20 IV (sucre canne, glucose de maïs)	- 20		- 5	
V (produits pétroliers)	- 60		- 30	

 $\Delta = 10-30\text{‰}$
 $\Delta = 10-15\text{‰}$

- 25 Une distinction nette entre les alcools biologiques (I-IV) et l'alcool technique (V) se manifeste par tous les paramètres.

0099810

21

A l'intérieur des échantillons biologiques, la différence est très nette entre l'alcool en provenance de la vigne (I, II) et de la betterave (III) d'une part (plantes C_3 , dont le produit primaire de la photosynthèse est une molécule à trois atomes de carbone) et
5 l'alcool à base de canne à sucre ou de maïs (IV) d'autre part (plantes C_4 , dont le produit primaire est une molécule à quatre carbones). Le critère ici est le taux global en carbone-13.

Il existe également une différence entre l'alcool en provenance de la vigne (I) et celui en provenance de la betterave (III)
10 aussi bien pour le deutérium que pour le carbone-13. Mais le taux en deutérium est extrêmement sensible aux facteurs extérieurs et saisonniers. Il décroît particulièrement

- avec la latitude géographique.
- avec l'altitude
- 15 - lorsque la température baisse
- lorsqu'on s'éloigne de l'influence maritime
- en passant de la Méditerranée à l'Océan Atlantique
- lorsque le fruit est recueilli prématurément.

Le procédé selon l'invention convient également pour
20 déterminer l'origine des acides gras. En plus de l'effet indiqué ci-dessus pour les autres substances (comportement des groupes à caractère hydrophobe et hydrophile), on a trouvé que pour un acide gras naturel en provenance de plantes C_3 , l'extrémité hydrophobe est plus pauvre en ^{13}C que l'extrémité hydrophile bien qu'il s'agisse chimiquement des
25 mêmes carbones ($-CH_2-$). On a constaté d'autre part une faible alternance régulière des abondances, de telle sorte qu'une semi-synthèse à partir de deux fractions naturelles peut être détectée par le procédé selon l'invention.

Le procédé selon l'invention a d'autres applications dans
30 des domaines très variés. On notera par exemple que le procédé de l'invention peut être utilisé pour déterminer les conditions de croissance optimales d'une plante donnée puisque l'on a constaté que la discrimination isotopique est minimale lorsque les conditions écologiques d'une plante sont optimales. Un autre exemple d'application du procédé est la détermination des substances organiques de l'animal pour déceler la ma-

0099810

22

nière dont il a été nourri. Certains métabolismes anormaux chez l'homme et l'animal sont susceptibles d'être détectés par l'analyse isotopique positionnelle. Le procédé de l'invention permet de nombreuses extensions et est susceptible de devenir ainsi une "véritable radiographie de la matière organique" .

5

0099810

23

REVENDICATIONS

1. Procédé pour identifier et, le cas échéant, pour
déterminer quantitativement les origines bio- et/ou techno-synthétiques
de substances organiques en fonction de leur taux global et avant tout
5 de leur matrice caractéristique de répartition intramoléculaire en
isotopes légers, stables et magnétiquement actifs, en particulier
en carbone-13, caractérisé en ce qu'il consiste à déterminer la
répartition isotopique positionnelle d'au moins un isotope léger,
stable et magnétiquement actif autre que le deutérium par résonance
10 magnétique nucléaire quantitative par transformée de Fourier.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce
qu'il consiste à enregistrer par résonance magnétique nucléaire
quantitative dans des conditions assurant une sensibilité suffisante
et une parfaite proportionnalité entre le nombre des noyaux résonnants
15 et l'amplitude du signal les spectres des noyaux concernés, en parti-
culier ceux du carbone-13, à calculer la surface des différentes
raies et à comparer lesdites surfaces par rapport à la moyenne
desdites surfaces.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé
20 en ce que, lors de l'enregistrement du spectre R.M.N., le nombre de
passages accumulés est compris entre 100 et 50 000, la résolution
numérique est comprise entre 0,8 et 0,05 Hz/point et en ce que l'angle
de nutation est de 90°.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,
25 caractérisé en ce que l'isotope est le carbone-13 et en ce que le
nombre de passages est compris entre 5 000 et 20 000, de préférence
5 000, et la résolution numérique est de 0,1 à 0,2 Hz/point.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,
caractérisé en ce que l'on calibre la sensibilité du spectromètre
30 R.M.N., en fonction de la fréquence sur le domaine de fréquence
utilisé et aux conditions d'enregistrement choisies, avec un mélange
de calibration contenant des composés de composition isotopique
globale connue tous miscibles entre eux, inertes les uns vis-à-vis
des autres, lesdits composés produisant chacun une seule raie en R.M.N.

0099810

24

pour un isotope donné, le mélange étant tel que les raies desdits composés soient espacées de façon relativement régulière sur toute la largeur du spectre.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il consiste à déterminer la répartition isotopique positionnelle du carbone-13 et en ce qu'il comprend en outre une détermination de la répartition isotopique positionnelle du deutérium.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le mélange de calibrage est un mélange dans l'eau lourde des composés suivants pour lesquels on a indiqué entre parenthèses la position relative de leur signal par rapport au diméthylsulfoxyde, exprimée en ppm et comptée positivement vers les champs faibles:

- thiocyanate de sodium (+100 ppm)
- urée $\text{NH}_2 \text{ CO NH}_2$ (+ 70 ppm)
- 15 - diméthylsulfoxyde $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
- glycol $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ (- 13,6 ppm)
- alcool méthylique CH_3OH (- 23,7 ppm)

en des quantités telles que chaque composé apporte la même quantité molaire de carbone.

20 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape de détermination isotopique par spectrométrie de masse à désorption par champ.

9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on procède à une mesure différentielle par rapport à une position donnée dans la molécule prise comme référence isotopique interne.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on enregistre, dans des conditions identiques, les spectres en modules.

11. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le calibrage interne du spectre est automatisé à l'aide d'une fonction polynomiale de compensation.

30 12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise comme moyen standard d'analyse une matrice de répartition isotopique prédéterminée par la formule chimique structurale, schéma isotopique interne selon lequel, en particulier pour l'élément carbone, les groupes à caractère hydrophile et/ou facilement recyclables pendant le métabolisme sont enrichis en isotope lourd par rapport à la teneur isotopique moyenne de la molécule, les groupes à caractère hydrophobe par contre sont appauvris en isotope lourd.

0099810

25

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le spectromètre est couplé avec un microprocesseur dans lequel on mémorise des compositions isotopiques standard.

5 14. Mélange de calibrage pour la détermination de la répartition isotopique du carbone-13, caractérisé en ce qu'il est un mélange dans l'eau lourde de :

- thiocyanate de sodium NaSCN (+ 100 ppm)
- urée $\text{NH}_2 \text{ CO } \text{NH}_2$ (+ 70 ppm)
- diméthylsulfoxyde $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
- 10 - glycol $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ (- 13,6 ppm)
- alcool méthylique CH_3OH (- 23,7 ppm)

en des quantités telles que chaque composé apporte la même quantité molaire de carbone.

15 15. Tube de calibrage, contenant le mélange selon la revendication 14.

16. Tube de calibrage selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est scellé.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0099810

Numéro de la demande

EP 83 40 1414

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 1)
A	US-A-3 925 721 (PETROFF) * Abrégé *	1	G 01 N 24/08 G 01 N 24/02 G 01 N 33/00
A	--- ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 42, no. 4, avril 1970, pages 109A-112A, New York, USA T.C. FARRAR: "Pulsed and fourier transform NMR spectroscopy" * Page 109A, colonne de gauche, paragraphe 1 *	1	
A	--- ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 51, no. 2, février 1979, pages 224A-232A, American Chemical Society, USA C.A. LUCCHESI: "The analytical approach" * Page 226A, paragraphe "Stable carbon isotope ratio method" *	1	
A	--- JOURNAL OF APPLIED SPECTROSCOPY, vol. 27, no. 5, novembre 1977, pages 1440-1443, Plenum Publishing Corporation, New York, USA A.G. ZHURAVLEV et al.: "Paramagnetic shifts in the PMR spectra of electron-donor organic compounds, induced by nitrogen tetroxide" * Page 1441, tableau 1 * --- --/	7, 14	G 01 N 24/08 G 01 N 24/02 G 01 N 24/04 G 01 N 33/14
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 24-10-1983	Examineur FARNESE G.P.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>			

0099810

Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 83 40 1414

Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)
A	PATENTS ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 5, no. 237 (P-157)[1115], 25 novembre 1982 & JP - A - 57 137 845 (HITACHI) 25-08-1982 * En entier *	15	
D,A	--- TETRAHEDRON LETTERS, vol. 22, no. 36, 1981, pages 3525-3528, Pergamon Press Ltd., Oxford, GB. G.J. MARTIN et al.: "Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative 2H NMR" * En entier *	1-6,8-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 24-10-1983	Examineur FARNESE G.P.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			